

A fitoplankton molekuláris diverzitása az Erdélyi-medence sós tavaiban

Keresztes Zsolt Gyula¹✉, Tamás Felföldi², Somogyi Boglárka³, Székely Gyöngyi¹, Bartha Csaba¹, Nicolae Dragoș¹, Márialigeti Károly², Nagy Erika⁴, Vörös Lajos³

¹ Babes-Bolyai Tudományegyetem, Molekuláris Biológia és Biotechnológia Intézet, Kolozsvár

² Eötvös Loránd Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

³ MTA, ÖK, Balatoni Limnológiai Intézet, Tihany

⁴ Babes-Bolyai Tudományegyetem, Matematika és Informatika Kar, Kolozsvár

✉ kereszteszsgy@gmail.com

Kivonat

Az Erdélyi-medence sós tavaira jellemző a magas trofitás és az erős emberi zavarás. Ezekben a tavakban pikocianobaktériumok és pikoeukarióta algák egyaránt előfordulnak jelentős részesedéssel az össz alga biomasszából magas trofitás mellett is. Mikroszkópos módszerek alkalmazásával megállapításra került hogy a nanophytoplankton a sós tavakban közönséges *Dunaliella* fajok dominálják. A fitoplankton mikroszkópos vizsgálatának újszerű eredményei indokoltá tették a fitoplanktont alkotó fajok azonosítását melynek legalkalmasabb módja a molekuláris biológiai módszerek alkalmazása. Vizsgálataink során PCR, denaturáló gradiens gél elektroforézis és szekvenciaelemzés alkalmazásával megállapítottuk, hogy a fitoplanktont eddig kontinentális vizekben nem ismer tengeri cianobaktériumok és tengeri eukarióta algák alkotják. A pikofitoplankton tengeri *Synechococcus* (Cyanobacteria) és tengeri illetve sós tavi *Picochlorum* (Chlorophyta) fajok alkotják. A tengeri pikofitoplankton mellett több tengeri nanoplanktonfaj (*Guillardia* sp., *Isochrysis* sp.) is azonosításra került. Ezekben a kontinentális sós tavakban azonosított tengeri algafajok jelenlétére magyarázat lehet a szél- és a vízimadarak általi terjesztés, esetleg a sósótegekből kioldódó algasejtek, azonban ennek a kiderítésére további vizsgálatok szükségesek.

Kulcsszavak: sós tó, pikofitoplankton, diverzitás, *Synechococcus*, *Picochlorum*

Bevezetés

Az Erdély-medencében a sóbányászat következtében nagyszámú sós tó keletkezett az idők során. Ezen mesterséges hipersós tavak kis felülettel (380-12000 m²) viszont igen nagy mélységgel (10-170 m) rendelkeznek (Alexe, 2010). A sós tavak többsége települések határain belül található. Könnyű megközelíthetőségüknek illetve vélt vagy valós gyógyhatásuknak köszönhetően olyannyira kedvelt fürdőhelyekké váltak, hogy egyes esetekben a fürdőzők denzitása meghaladja az 1100 fő/hektárt. Népszerűségük hozadéaként partjukat körülépítették illetve rekreációs központokat hoztak létre körülöttük. Ezen sós tavak nem rendelkeznek sem befolyóval sem kifolyóval, vízutánpótlásuk csapadék útján valósul meg. Korábbi vizsgálatok megállapították, hogy az erdélyi sós tavak igen magas emberi zavarás alatt állnak, a tavak igen magas trofitással rendelkeznek, többségükben hipertrófnak illetve eutrófnak minősülnek (Keresztes és mtsai 2011). Megállapítást nyert, hogy a nanophytoplankton Chlorophyta, Haptophyta és Bacillariophyceae taxonok alkotják, illetve hogy a nanoplankton a sós vizekből közismert *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco fajok dominálják (Keresztes és mtsai 2011). Ezekben a sós tavakban pikocianobaktériumok és pikoeukarióta algák egyaránt előfordulnak illetve hipertróf viszonyok mellett pikofitoplankton dominancia fordulhat elő, ami ellentmond a tengerekben és a kontinentális vizekben megfigyelhető általános trendnek (Keresztes és mtsai 2011). Megismertük tehát hogy Erdély sós tavaiban különlegesen fontos szerepet tölt be a pikofitoplankton, melyeknek azonban fajszintű azonosítása mikroszkópos módszerekkel nem lehetséges a sejtek kis mérete és a sajátos morfológiai bélyegek hiánya miatt. Jelen tanulmány legfőbb célja volt megismerni Erdély sós tavainak ezidáig teljesen ismeretlen genetikai diverzitását, illetve molekuláris biológiai módszerek (PCR, DGGR, szekvencia analízis) alkalmazásával meghatározni a fitoplanktont alkotó fajokat, különös figyelmet fordítva a pikofitoplanktonra.

Anyag és módszer

A mintavételezés 2010 júniusában és 2011 februárjában történt Erdély öt településének tíz hiperós tavaiból (**1. ábra**). Nyáron a kevert felszíni rétegekből míg télen több különböző mélységből történt a mintavétel. A mintavételt követően a mintákat hűtőtáskában, sötétben laboratóriumba szállítottuk. A fitoplanktont alkotó fajok azonosítása

cianobaktériumokra és zöldalgákra specifikusan történt PCR, denaturáló gradiens gél elektroforézis (DGGE) és szekvencia elemzés felhasználásával a Keresztes és mtsai-ban (2012) leírtak alapján.

1. ábra. A vizsgált tavak földrajzi elhelyezkedése. Désakna [Lacul Cabdic (1)], Szék [Lacul Băilor (2) és Lacul Săpat (3)], Kolozs [Lacul Băilor Cojocna (4) és Lacul Durgău Cojocna (5)], Torda [Lacul Tarzan (7), Lacul Ocnei (8) és Lacul Rotund (9)], Vízakna [Lacul Ocnița-Avram Iancu (6) és Lake Fără Fund (10)]. Zárójelben a tavak román neve és a jelen tanulmányban használt azonosító kódjuk.

Eredmények és értékelésük

Az Erdélyi-medence sós tavaiban molekuláris biológiai módszerekkel azonosított fitoplankton fajok az 1. táblázatban vannak felsorolva. A cianobaktériumokat tengeri pikofitoplankton kládba tartozó *Synechococcus* sp. RS9918 törzs képviselői alkották és az 5. számú tóból kerültek elő. A tengeri pikofitoplankton kládba tartozó *Synechococcus* (Cyanobacteria) fajok átalánosan elterjedtek óceánokban illetve tengerekben (Fuller és mtsai, 2003; Zwirgmaier és mtsai, 2008) és molekuláris alapon jól elkülönülnek a kontinentális vizekben előforduló pikocianobaktériumoktól (Crosbie és mtsai, 2003). Az eukariota pikoalgákat a *Picochlorum* (Chlorophyta) nemzetségbe tartozó zöldalgák alkották. A *Picochlorum* nemzetségbe tartozó fajok széles halotoleranciával rendelkeznek tengeri és hipersós környezetben is előfordulnak, jelenlétüket három (1., 4., 6. tó) erdélyi sós tóban sikerült igazolni. Az 5. tóból származó szekvenciák 95,6 %-os hasonlóságot mutattak a *Rhizochromulina* sp. CCMP 1253 (Heterokontophyta) fajhoz és egy eddig még tenyésztésbe nem vitt piko mérettartományba tartozó dictyochophyte RCC332 (Heterokontophyta) fajhoz. A kis hasonlósági értékek alapján valószínűsíthető egy eddig ismeretlen dictyochophyte faj jelenléte, melynek azonosítása az általunk alkalmazott módszerekkel nem lehetséges. Az általunk azonosított fajok többségét piko méret feletti méretkategóriába tartozó eukariota algák alkották változatos taxonómiai besorolással. A sós tavakból származó szekvenciák a *Guillardia* (Cryptophyta), *Isochrysis* (Haptophyta), *Amphora* és *Navicula* (Heterokontophyta) fajokkal mutattak nagymértékű hasonlóságot. Az 1. tóban előforduló *Guillardia theta* illetve a 8. és 9. tóban megtalált *Isochrysis* sp. fajok jelenlegi tudásunk szerint ezidáig előfordulásukat csak tengerekből és óceánokból jelezték. A vizsgált tavainkból előkerült diatoma szekvenciák egyformán magas hasonlóságot mutattak az *Amphora*, *Cymbella* és *Navicula* nemzetségekhez. Előfordulásuk a 6. 8. és 10. tóban vált bizonyossá. Az alkalmazott Chlorofita-specifikus primerekkel *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Ankyra* és *Hormotila/Chlorococcum* nemzetségbe tartozó fajokat is sikerült azonosítani. Ezek közül néhány tengerekben és/vagy sós élőhelyeken fordul elő míg mások édesvízi fajoknak bizonyultak. A *Chlamydomonas* polifiletikus nemzetségbe tartozó fajok tengerekben és édesvizekben is egyaránt előfordulnak (Harris, 2009; Leliaert és mtsai 2012), míg a *Dunaliella* fajok a sós tavak legjellemzőbb algái (Estrada et al. 2004; Řeháková és mtsai, 2009; Wu és mtsai, 2009). Az *Ankyra* és *Hormotila* édesvízi zöldalga fajok jelenlétét csak 2. tó esetében sikerült igazolni. Erdély sós tavaiban molekuláris módszerekkel azonosított algataxonok egy része (*Picochlorum* és *Dunaliella*) a hipersós környezetre jellemző összetételt mutat, ugyanakkor bizonyosságot nyert, hogy ezen kontinentális víztestekben tengeri fajok (pikocianobaktériumok, Cryptophyták, Haptophyták) is ugyancsak előfordulnak.

1. Táblázat. Erdély sós tavaiból, molekuláris módszerekkel azonosított fitoplankton fajok jegyzéke, csillaggal jelölve a pikofitoplankton képviselőit.

Tó kódja	Leghasonlóbb törzs (NCBI azonosító kód)	Hasonlóság (%)	Divízió	Élőhely	Referencia
(5)	<i>Synechococcus</i> sp. RS9918 (AY172828)*	100	Cyanobacteria	Tengeri	Fuller és mtsai, 2003
(1)	<i>Guillardia theta</i> (AF041468)	99	Cryptophyta	Tengeri	Douglas és Durnford, 1989
(8), (9)	<i>Isochrysis</i> sp. SAG 927-2 (X75518)	100	Haptophyta	Tengeri	Huss és mtsai (nem közölt)
(8), (6)	<i>Amphora coffeaeformis</i> C107 (FJ002183)	99,7	Heterokontophyta	Tengeri/ Brakkvízi	Rampen és mtsai, 2009
(10)	<i>Navicula phyllepta</i> C15 (FJ002222)	100	Heterokontophyta	Tengeri	Rampen és mtsai, 2009
(5)	<i>Rhizochromulina</i> sp. CCMP1253 (AY702125)	95,6	Heterokontophyta	Tengeri	Fuller és mtsai, 2006
	Dictyochophyte sp. RCC332	95,6	Heterokontophyta	Tengeri	Fuller és mtsai, 2006

	(AY702151)*				
(6), (1)	<i>Picochlorum oklahomense</i> UTEX 2798 (AY422073)*	99,7	Chlorophyta	Hipersós tó	Henley és mtsai, 2004
(6), (4)	<i>Picochlorum</i> sp. RCC289 (AY702148)*	99,3	Chlorophyta	Tengeri	Fuller és mtsai, 2006
(8), (1)	<i>Chlamydomonas pulsatilla</i> CCCryo 038-99 (AF514404)	100	Chlorophyta	Tengeri / sarkvidéki	Leya és mtsai, (nem közölt)
	<i>Chlamydomonas kuwadae</i> NIES-968 (AB451190)	100	Chlorophyta	Édesvízi	Nakada és Nozaki, 2009
(6)	<i>Dunaliella salina</i> SAG 19-3 (EF473739)	99,7	Chlorophyta	Hipersós tó	Di Giuseppe és Dini (nem közölt)
(2)	<i>Ankyra judayi</i> SAG B17.81(U73469)	99,7	Chlorophyta	Édesvízi	Buchheim és mtsai, 2001
(2)	<i>Hormotila blennista</i> (U83123)	98.8	Chlorophyta	Édesvízi	Booton és mtsai, 1998

Következtetés

Jelen tanulmány elsőként vizsgálta molekuláris biológiai módszerekkel Erdély sós tavainak fitoplankton összetételét. Megállapítást nyert hogy ezen sós tavakban a fitoplankton főleg tengeri cianobakériumok és tengeri eukariota algák alkotják. A pikofitoplankton tengeri *Synechococcus* (Cyanobacteria) és tengeri illetve sós tavi *Picochlorum* (Chlorophyta) fajok alkotják. Egy eddig le nem írt piko-mérettartományba eső ostoros Dictyochophyte faj jelenléte is valószínűsíthető ezekben a sós tavakban. Annak kiderítése, hogy a tengeri fajok jelenléte szél által illetve vízimadarak terjesztésével vagy az őstengerek eltűnésekor visszamaradt sóból való feléléddel magyarázható-e további vizsgálataink tárgyát képezi.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást az OTKA (K 73369), a CNCSIS-UEFISCSU PN II-RU TE 306/2010 továbbá a “Human Resources Development, Contract POSDRU/88/1.5/S/60185– Doctoral studies: through science towards society” és Collegium Talentum (Tatabánya, Magyarország) támogatta.

Irodalom

Alexe M., 2010: A study on the salt lakes of the Transylvanian Basin. Cluj University Press, Cluj-Napoca (in Romanian)

Booton G.C., G. L. Floyd, P. A. Fuerst, 1998: Polyphyly of tetrasporalean green algae inferred from nuclear small-subunit ribosomal DNA. J Phycol 34:306–311

Buchheim M. A., E.A. Michalopoulos, J. A. Buchheim, 2001: Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18S and 26S rDNA data. J Phycol 37:819–835

Crosbie N. D., M. Pöckl, T. Weisse, 2003: Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-intergenic spacer sequence analyses. Appl Environ Microbiol 69:5716–5721

Douglas E, D. G. Durnford, 1989: The small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase is plastid-encoded in the chlorophyll-containing alga *Cryptomonas phi*. Plant Mol Biol 13:13–20

Estrada M, P. Henriksen, J. M. Gasol, E. O. Casamayor, C. Pedrós-Alió, 2004: Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. FEMS Microbiol Ecol 49:281–293

- Fuller N. J., D. Marie, F. Partensky, D. Vault, A. F. Post, D. J. Scanlan, 2003: Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Appl Environ Microbiol* 69:2430–2443.
- Fuller N. J., C. Campbell, D. J. Allen, F. D. Pitt, K. Zwirgmaier, F. Le Gall, D. Vault, D. J. Scanlan, 2006: Analysis of photosynthetic picoeukaryote diversity at open ocean sites in the Arabian Sea using a PCR biased towards marine algal plastids. *Aquat Microb Ecol* 43:79–93
- Harris E. H., 2009: *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic Press, Elsevier, Oxford
- Henley W. J., K. M. Major, J. L. Hironaka, 2002: Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae. *J Phycol* 38:757–766
- Leliaert F, D. R. Smith, H. Moreau, M. D. Herron, H. Verbruggen, C. F. Delwiche, O. De Clerck, 2012: Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit Rev Plant Sci* 31:1–46
- Keresztes, Z. G., E. Nagy, B. Somogyi, B. Németh, C. Bartha, G. Székely, N. Dragoş, L. Vörös, 2011: Az Erdélyi-medence trofitási viszonyai. *Hidrol. Közl.* 91(6): 46-48
- Keresztes, Z. G., T. Felföldi, B. Somogyi, G. Székely, N. Dragos, K. Márialigeti, C. Bartha, L. Vörös, 2012: First record of picophytoplankton diversity in Central European hypersaline lakes. *Extremophiles* 16:759–769.
- Nakada T., H. Nozaki, 2009: Taxonomic study of two new genera of fusiform green flagellates, *Tabris* gen. nov. and *Hamakko* gen. nov. (Volvocales, Chlorophyceae). *J Phycol* 45:482–492
- Rampen SW, S. Schouten, F. E. Panoto, M. Brink, R. A. Andersen, G. Muyzer, B. Abbas, J. S. S. Damsté, 2009: Phylogenetic position of *Attheya longicornis* and *Attheya septentrionalis* (Bacillariophyta). *J Phycol* 45:444–453
- Řeháková K., E. Zapomělová, O. Prášil, Veselá J, Medová H, A. Oren, 2009: Composition changes of phototrophic microbial communities along the salinity gradient in the solar saltern evaporation ponds of Eilat, Israel. *Hydrobiologia* 636:77–88
- Wu Q. L. , A. Chatzinotas, J. Wang, J. Boenigk, 2009: Genetic diversity of eukaryotic plankton assemblages in Eastern Tibetan lakes differing by their salinity and altitude. *Microb Ecol* 58:569–581
- Zwirgmaier K., L. Jardillier, M. Ostrowski, S. Mazard, L. Garczarek, D. Vault, F. Not, R. Massana, O. Ulloa, D. J. Scanlan, 2008: Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environ Microbiol* 10:147–161

The molecular diversity of phytoplankton in the salt lakes of the Transylvanian Basin

Abstract

The salt lakes of the Transylvanian Basin are characterized by high trophic state and strong human impact. In these lakes, both picocyanobacteria and eukaryotic algae occur in a very high contribution to the total algal biomass, even under a high trophic state. With the application of microscopic methods, it was determined that the nanophytoplankton is dominated by common salt tolerant species of *Dunaliella*. The new results obtained from the microscopic study of phytoplankton have justified the identification of the phytoplankton species, and the best methods for this are the molecular biological methods. During our study, we used PCR, denaturing gradient gel electrophoresis and sequence analysis and we can state that the phytoplankton is formed by marine cyanobacteria, marine picoeukaryotes and eukaryotic marine algae, unknown until now in the continental waters. The pikofitoplankton is formed by marine *Synechococcus* (cyanobacteria) and marine/hypersaline *Picochlorum* (Chlorophyta) species. In addition, besides the marine pikofitoplankton, a lot of nanoplankton species (*Guillardia* sp., *Isochrysis* sp.) were identified. The presence of the algae species identified in these continental saline lakes can be explained with the help of the wind and by the dissemination of water birds, perhaps from dissolution of salt layers. However, in order to ascertain these facts, further studies are necessary.



1. ábra. A vizsgált tavak földrajzi elhelyezkedése. Désakna [Lacul Cabdic (1)], Szék [Lacul Băilor (2) és Lacul Săpat (3)], Kolozs [Lacul Băilor Cojocna (4) és Lacul Durgău Cojocna (5)], Torda [Lacul Tarzan (7), Lacul Ocnei (8) és Lacul Rotund (9)], Vízakna [Lacul Ocnița-Avram Iancu (6) és Lake Fără Fund (10)]. Zárójelben a tavak román neve és a jelen tanulmányban használt azonosító kódjuk.